

〔報 文〕

β -カロテン吸収に関する スナネズミとラット間の比較

清水史子・小川睦美・福場博保

A Comparison of β -carotene Absorption in the Small Intestine of Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*) and Rats

Fumiko SHIMIZU, Mutsumi OGAWA and Hiroyasu FUKUBA

Mongolian gerbils have been reported to have a similar β -carotene absorption system to humans. The authors examined *in vitro* as to whether and to what extent the small intestine of gerbils and rats can absorb β -carotene and convert it to retinol, and also checked whether β -ionone ring of β -carotene would be opened by the enzyme in their small intestine membranes.

β -carotene solution was injected into the removed small intestine of gerbils and rats and they were incubated for 60 min. at 37°C. After incubation, carotenoid absorbed in mucous membrane of the samples was measured.

The results show that both gerbils and rats absorbed β -carotene and produced retinol from the absorbed β -carotene in their small intestines, but the function of gerbils was greater compared with that of rats. The data suggest that the Mongolian gerbil can be a useful substitute model of humans for evaluating the absorption of β -carotene. From the fact that lycopene was not detected in the examined small intestine membranes of gerbils and rats, the authors think that lycopene might not be synthesized from β -carotene in the small intestine of gerbils and rats.

Key words: β -carotene (β -カロテン), lycopene (リコペン), retinol (レチノール), Mongolian gerbil (スナネズミ), small intestine (小腸)

緒 言

β -カロテンはプロビタミン A 作用に加え、ガン細胞の増殖抑制作用やコレステロール生成調節作用などを有することから、カロテノイド自身の生理活性に注目が集まっている¹⁾。ヒトは自らカロテノイドを合成することができないことから、緑黄色野菜などの食品より体内に取り込むが、摂取後の体内組織における研究の多くは、血清への取り込みに関するものであり、消化吸收を含めた体内動態に関する研究はごくわずかである^{2~4)}。筆者らはこれまでに、ヒトを対象に β -カロテン投与によるカロテノ

イドの体内動態に関する検討を行ったところ、糞便中リコペンが増加することを見出し、大腸内に存在する腸内細菌の影響によるものではないかと推測した^{5), 6)}。しかし、ヒトの血液や排泄物を採取することは可能だが、体組織を採取することが不可能であるため、 β -カロテン投与後の体組織内での分布や代謝がどのように行われているかを明らかにすることはできない。さらに、ヒトを研究対象とすることは、食生活の制限など、精神的・肉体的な負担が大きいため、動物による実験系を組み立てる必要がある。

通常、実験動物として用いられるラットは、腸管

内での β -カロテン-15, 15'-ジオキシゲナーゼ活性が非常に高く、摂取した β -カロテンを速やかに開裂し、レチノールへ転換させるため、 β -カロテンとして体内に吸収・蓄積されにくい^{7), 8)}。よって、ラットを用いたカロテノイド吸収代謝研究の結果をヒトに還元することはできない。

一方、スナネズミ (*Meriones unguiculatus*) は、ラットと同目の齧歯目であるにも拘わらず、 β -カロテンからビタミン A への転換率がヒトと同程度で、ヒトの β -カロテン吸収、代謝に類似している^{9), 10)}ことがこれまでにわかっている。

そこで、本実験では、 β -カロテン吸収能があるスナネズミと、 β -カロテン非吸収動物であるラット、それぞれの摘出した小腸を用いて、 β -カロテンの開裂状態及び腸管吸収について比較し、スナネズミがヒトの β -カロテンの吸収代謝モデルとして有用であるか否かを検討した。さらに、これまでに、 β -カロテン投与による糞便中リコペンの増加は、胃や小腸の人工消化管モデルによる消化実験では起こらない^{11), 12)}ことがわかっているが、実際にスナネズミやラットの小腸粘膜内に存在する酵素等の影響については確認されていないことから、 β -カロテン投与による小腸内でのリコペン生成の有無についても検討した。

実験方法

1. スナネズミ及びラット

15 週齢オススナネズミ、15 週齢 Wistar 系オスラット (日本エスエルシー (株)) 各 8 匹を用いた。解剖前日まで、固形飼料 (日本農産工業 (株) 社製、商品名: ラボ MR ストック) 及び水は自由摂取とした。飼育環境は、昭和女子大学動物飼育室、室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 60%、明暗サイクルは 8:00~20:00 を明期とした。

2. 基質溶液の調整

10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.7) 50 ml に 15 mmol 塩化ナトリウム、0.7 mmol 塩化カリウム、0.5 mmol グルタチオン、0.5 mmol コール酸ナトリウム、0.2 mmol ニコチンアミド、0.2 mmol ニコチン

アミドアデニンジヌクレオチド還元型、及び 0.1 mmol モール塩を溶解し、 β -カロテンを加え、同緩衝液で 100 ml とし、100 μM β -カロテン基質溶液 (以下基質溶液 BC) とした¹³⁾。また、 β -カロテンを加えない基質溶液 (以下基質溶液 NO) を準備した。なお、本研究で用いた β -カロテンは、太陽化学 (株) 社より提供されたサンアクティブ V-BC 10 Lot 412091 を用いた。これは β -カロテン結晶を乳化し、水分散性及び安定性の高い β -カロテン水溶液で、10.3%の β -カロテンを含有し、食品添加物として用いられている。本実験では吸収スペクトルを測定し、吸収極大波長における吸光度と、吸光係数から濃度を算出してから用いた。

3. 腸管摘出及びインキュベーション

解剖は解剖前日より一昼夜絶食後、エーテル吸引麻酔下にて行った。開腹し、小腸を摘出後、小腸にシリンジで生理食塩水を注入し、内容物を除去した後、氷冷生理食塩水に浸した。小腸を上部からスナネズミでは約 10 cm ずつ計 2 本、ラットでは約 10 cm ずつ計 5 本切断した。切断した小腸の片方を糸で縛り、その中にシリンジを用いて基質溶液 BC を注入した (スナネズミ: 0.5 ml, ラット: 1 ml)。注入後、もう一方の端を糸でしっかり結び、試験試料とした。50 ml 容サンプル瓶に基質溶液 NO を 30 ml 入れ、 37°C 、15 分間予備加温後、その中に試験試料を 1 本ずつ加え、スターラーで攪拌しながらインキュベートした。60 分間経過後、サンプル瓶より試験試料を取り出して、10 mM HCl に数秒間浸して反応を停止させ、生理食塩水にて軽く洗浄後、水分をキムワイプで吸い取り、小腸の重量を秤量した。次に注入液 (基質溶液 BC) を取り出し、小腸より粘膜を剥離した後、小腸残部と取り出した注入液の重量を秤量し、小腸重量との差を粘膜重量とした¹³⁾。粘膜と残部からのカロテノイドの抽出は Boileau らの方法¹⁴⁾ (Fig. 1) を用いた。すなわち、組織 (0.2~0.3 g) をはさみで碎き、エタノール (BHT 1 g/L 含有) 4 ml で洗い流し、次に水酸化カリウム溶液 (500 g/L 含有) を 1 ml 加えた。 60°C で 25 分間ケン化後、直ちに氷冷して急速に冷却した。

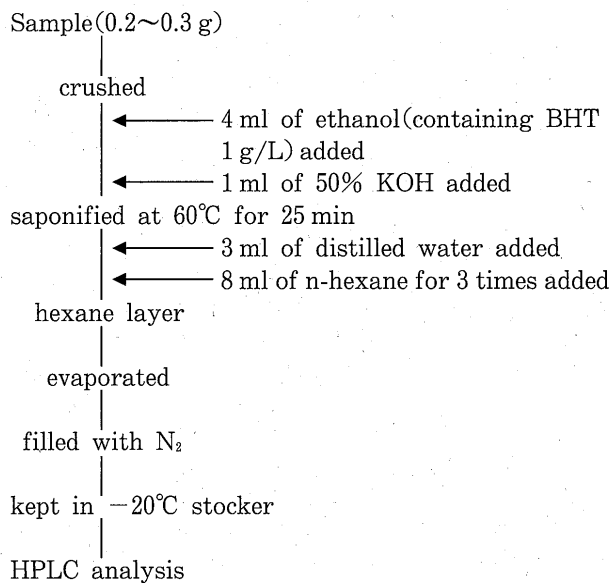


Fig. 1. Extraction procedure of carotenoids from internal organs

次に蒸留水 (3 ml) を加え、ヘキサン (8 ml×3 回) で不ケン化物としてカロテノイドを抽出した。抽出したヘキサン層を合わせ、エバポレーターで減圧乾固し、直ちに窒素充填後、HPLC 分析まで -20°C で冷凍保存した。さらに注入液 (基質溶液 BC)、基質溶液 NO はアセトン:メタノール (1:1, v/v)、次いでヘキサンにて抽出し、ヘキサン層を減圧乾固後、組織同様、直ちに窒素充填後、HPLC 分析まで -20°C で冷凍保存した。カロテノイドの分析は坂本らの方法¹⁵⁾を用い、HPLC 法により行った。

4. 統計処理

実験結果は平均±標準偏差 (n=8) で示した。スナネズミとラットの 2 群間の比較には *t* 検定を用い、*p*<0.05 の時、有意差ありとした。統計処理ソフトとして StatView (5.0) を使用した。

実験結果

スナネズミとラット小腸での β-カロテン吸収量及びレチノール転換量を Fig. 2~4 に示した。さらに β-カロテンの吸収率とレチノール転換率を Table 1 に示した。

スナネズミ、ラットともに小腸内に β-カロテン及びレチノールが検出された。特に、スナネズミの

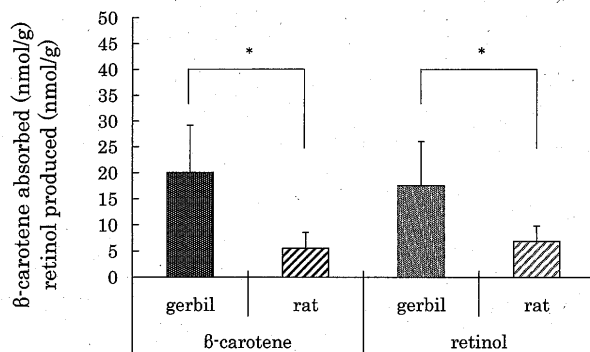


Fig. 2. β-carotene absorption and retinol production in small intestine residue
The difference between the rat group was considered significant when **p*<0.05

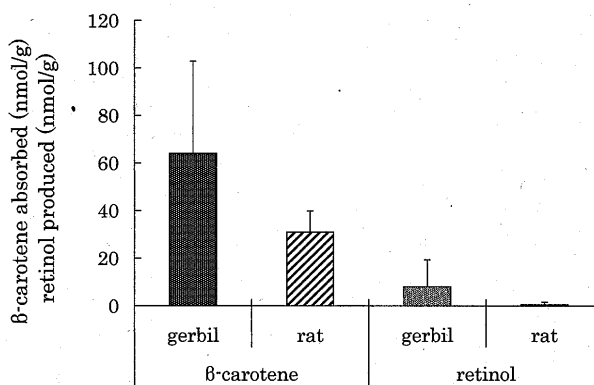


Fig. 3. β-carotene absorption and retinol production in small intestine mucous membrane

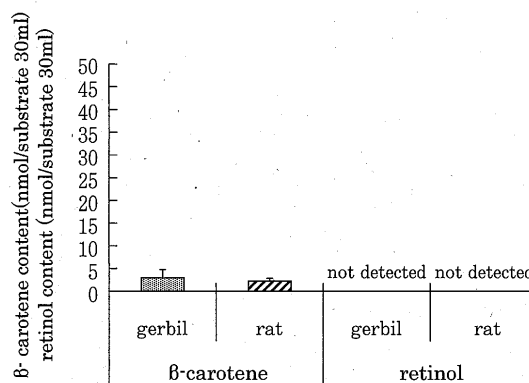


Fig. 4. β-carotene content and retinol content in substrate NO

小腸はラットと比較して有意に β-カロテンの取り込みがよく、さらに β-カロテンのレチノール転換率も大きいことが示された。しかし、スナネズミ、ラットどちらも β-カロテンからレチノールを生じ

Table 1. β -carotene absorption and retinol production in the small intestines of gerbils or rats

	gerbil	rat
Total β -carotene absorbed(nmol/g intestine)	96.8 \pm 38.7*	40.2 \pm 10.2
Total retinol converted(nmol/g intestine)	25.6 \pm 18.3*	7.4 \pm 4.1
Ratio of retinol converted to β -carotene absorbed(%)	17.1	10.4
Absorption ratio of β -carotene(%)	47.6	28.3

Total β -carotene absorbed(nmol)

= (small intestine residue β -carotene)nmol + (small intestine mucous membrane β -carotene)nmol
+ (1/2) (total retinol converted)nmol.

Total retinol converted(nmol)

= (small intestine residue retinol)nmol + (small intestine mucous membrane retinol)nmol.

The difference between the rat group was considered significant when * p <0.05.

る際の中央開裂以外の転換方法である、エキセントリック開裂により生じる β -アポ-カロテナールは検出されなかった。同様に、小腸粘膜、小腸残部、小腸注入液(基質溶液BC)、基質溶液NOより、リコペンは検出されなかった。

考 察

本実験では、ヒトのカロテノイド吸収・代謝モデルの検討を行うことを目的とし、 β -カロテン蓄積動物であるスナネズミと非蓄積動物であるラットの小腸を用いて、小腸粘膜での β -カロテン開裂状態、吸収及びレチノール、リコペン生成について検討した。

β -カロテンの開裂は、スナネズミ、ラットともにエキセントリック開裂によって生じる β -アポ-カロテナールの生成はほとんどなく、 β -カロテン-15, 15'-ジオキシゲナーゼによる中央開裂でレチノールが生成されたものと推測された。これらの結果は、Nagao らが行った豚小腸膜抽出物に β -カロテンを添加し、インキュベートした後の β -カロテンの開裂状態¹⁶⁾や、高木らのラット反転小腸を用いた β -カロテン吸収実験の結果¹³⁾と類似していることから、小腸での β -カロテン開裂は中央開裂が優勢であると示唆された。よって、生体内に存在する β -アポ-カロテナールは、小腸内で開裂したものが吸収・蓄積されるのではなく、血液や組織中に蓄積されたカロテノイドが、自動酸化あるいは活性酸素との反応により酸化的分解することによって生じるものと推測される^{17), 18)}。本実験では、スナネズミの

小腸が非常に小さく、十二指腸や空腸、回腸の区分をすることができなかったため、ラットに関しても同様に区分せず、小腸全体の β -カロテン吸収量として測定した。よって、各部位での β -カロテンの吸収や開裂の差異を検討するまでには至らなかった。また、スナネズミの β -カロテン-15, 15'-ジオキシゲナーゼに関して、未だ詳しい知見は得られておらず、今後、それらについて検討する必要がある。

スナネズミとラット間の比較では、スナネズミは小腸内に取り込んだ β -カロテンを速やかに開裂し、レチノールに転換させると同時に、 β -カロテンそのものの吸収率も約50%と、比較的取り込みやすいことが観察された。この結果は、ヒトが、加熱処理や粉碎等により細胞組織が破壊され β -カロテンが露呈しているもの(ニンジンピューレやカボチャペースト等)や β -カロテン結晶を可溶化し飲料にしたもの、油脂に懸濁したサプリメント等を摂取した場合の吸収率(40~80%程度)¹⁹⁾と同程度であった。また、 β -カロテンは通常、遊離脂肪酸、コレステロール、モノアシルグリセロール、胆汁酸塩、リゾレシチンなどとともに複合ミセルを形成し可溶化した状態で、小腸粘膜上皮細胞内に取り込まれる⁷⁾。よって本実験に使用した β -カロテンは、結晶が乳化状態で可溶化しやすいことから、スナネズミの小腸粘膜上皮細胞内への取り込みもスムーズであったと考えられる。以上のことから、スナネズミの β -カロテン吸収は、ヒトのそれと類似することが示唆された。

一方、ラットは、小腸内に β -カロテンそのもの

を取り込むことができるが、その割合はスナネズミの約40%程度と低く、さらに、 β -カロテンからのレチノールへの転換率も、約10%程度（スナネズミは約17%）と、ラットの β -カロテン利用性は低いことが示唆された。この結果は、ラットの β -カロテンからレチノールへの開裂は速やかであるというこれまでの知見^{7),8)}と矛盾した結果となった。本来、摘出した小腸を用いた吸収実験では、反転小腸を用いるが、スナネズミの小腸が非常に小さく、反転すると粘膜が剥がれ落ちる危険性があることから、本実験では条件を揃えるため、ラットの小腸も粘膜を内側にしたまま袋状にし、反応液（基質溶液BC）を内部に注入した。反応液（基質溶液BC）の濃度は、高木ら¹³⁾のラット反転小腸吸収試験を参考に、100 μ Mと設定し、基質溶液は β -カロテン-15, 15'-ジオキシゲナーゼ活性の最適pH 7.7²⁰⁾とした。しかし粘膜が内側のため、反応液（基質溶液BC）と粘膜が十分に接触せず、酵素反応があまり進まなかったと考えられる。そのためにラットのレチノール転換率が低値になったと推測される。今後、小腸粘膜ホモジネートを用いることで試料の均一化を図ったり、基質溶液の濃度や、小腸粘膜内取り込みの向上に関与するミセルの構成などを変え、効率よく、 β -カロテンやレチノールを回収できる方法の検討が必要である。

さらに、 β -カロテン投与による小腸内リコペン生成について検討したが、本実験では小腸内、反応液中からはリコペンが検出されなかった。哺乳動物は、フィトエンシンターゼが進化の過程において欠落してしまったため、カロテノイドを合成することができないと言われている。また、カロテノイドの合成経路において、カロテノイドの基本骨格であるリコペンから β -カロテンへの生成は不可逆的とされ、今日までその逆の反応が起こることは、植物、微生物、さらにヒトにおいて確認されていない。しかし、筆者らがヒトを対象に β -カロテンを投与したところ、糞便中リコペン排泄が増加する現象が起こり、その一つの可能性として、小腸粘膜上皮細胞内に存在する酵素により、 β -カロテンの環状構造が開環することが考えられた。そこで、スナネズミ

及びラット小腸内において、 β -カロテンの環状構造の開環が起こるか否か検討したが、それぞれの β -カロテン代謝は、レチノールの生成及び β -カロテンそのままの吸収に限定され、リコペンの生成は起こらないことが示唆された。今後、 β -カロテン投与によるリコペン生成に関して、小腸以降での反応、すなわち大腸での腸内細菌による代謝等の影響も考慮し検討する必要がある。

以上の結果より、スナネズミはラットと比較して、 β -カロテンの吸収及びレチノール転換率が高く、さらにヒトと β -カロテンの取り込みが類似していることから、ヒトの β -カロテン吸収モデルとして有用であると示唆された。今後、さらに β -カロテン以外のカロテノイドの吸収に関しても検討し、広くカロテノイド吸収代謝モデルとして有用であるか検討する必要がある。

要 約

本研究は、 β -カロテン吸収動物であるスナネズミと、 β -カロテン非吸収動物であるラット、それぞれの小腸を用いて、 β -カロテンの腸管吸収について比較した。さらに、ヒトを対象にした β -カロテン投与による糞便中リコペンの増加が、小腸粘膜によるものであるかスナネズミ及びラットの小腸を用いて検討したところ、以下のことが明らかとなった。

- (1) スナネズミ、ラットともに小腸内への β -カロテン吸収が見られた。さらに、どちらも小腸内でのレチノール生成も観察された。とくに、スナネズミの小腸は、ラットと比較して有意に β -カロテンの取り込みがよいことが観察された。さらに、スナネズミは β -カロテンのレチノール転換率がラットよりも大きいことが示され、ヒトの β -カロテン吸収モデルとして有用であることが示唆された。
- (2) スナネズミ及びラットの小腸に β -カロテンを投与し、37℃、60分間培養したところ、小腸内、反応液内ともにリコペンの生成は見られなかった。

文 献

- 1) 寺尾純二, 長尾昭彦: カロテノイドの吸収代謝と生理活性. 日本油化学会誌 **52**, 283-293 (1999)
- 2) Shiau A, Mobarhan S, Liao Y, Ford C, Friedman H, Frommel TO, Stacewiczapuntzakakis M, Benya R, Bowen P: Assessment of the intestinal retention of β -carotene in humans. *J Am Coll Nutr* **13**, 369-375 (1994)
- 3) Van Lieshout M, West CE, Van De Bovenkamp P, Wang Y, Sun Y, Van Breemen RB, Muhilal DP, Verhoeven MA, Lugtenburg J: Extraction of carotenoids from feces, enabling the bioavailability of beta-carotene to be studied in Indonesian children. *J Agric Food Chem* **51**, 5123-5130 (2003)
- 4) Briviba K, Bub A, Schnaebelen K, Rechkemmer G: Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice dose not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J Nutr* **134**, 1081-1083 (2004)
- 5) 清水史子, 小川睦美, 福場博保: ニンジンジュース連続飲用によるカロテノイドの体内蓄積と排泄. 昭和女子大学大学院生活機構研究科紀要 **14**, 39-46 (2005)
- 6) Shimizu F, Ogawa M, Fukuba H: Accumulation and excretion of carotenoids after regular ingestion of carrot juice with a lycopene-free diet. *J Home Econ Jpn* **57**, 151-157 (2006)
- 7) 武藤泰敏: 『レチノイド・カロテノイドー体内代謝と発癌予防ー』南山堂, 東京, 45-58 (1997)
- 8) Ribaya-Mercado JD, Holmgren SC, Russell RM, Fox JG: Dietary β -carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J Nutr* **119**, 665-668 (1989)
- 9) Lee CM, Lederman JD, Hofmann NE, Erdman JW Jr: The Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of β -carotene to vitamin A. *J Nutr* **128**, 280-286 (1998)
- 10) Lee CM, Boileau AC, Boileau TWM, Williams AW, Swanson KS, Heintz KA, Erdman JW Jr: Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr* **129**, 2271-2277 (1999)
- 11) 竹内睦美: 加工・調理によるカロチノイドの生理活性の変化について. 昭和女子大学大学院生活機構研究科博士論文 (1992)
- 12) 鈴木由香: 野菜組織中カロチノイドの吸収効率に関する検討. 昭和女子大学大学院生活機構研究科修士論文 (2002)
- 13) 高木茂明, 広尾禎久, 大田守也, 木村吉伸: ラット反転小腸における β -カロテンの吸収と代謝挙動. 日本栄養・食糧学会誌 **47**, 287-294 (1994)
- 14) Boileau TWM, Clinton SK, Erdman JW Jr: Tissue lycopene concentration and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *Am Soc Nutr Sci* **130**, 1613-1618 (2000)
- 15) 坂本秀樹, 森啓信, 小嶋文博, 石黒幸雄, 有本祥三, 今江祐美子, 難波経篤, 小川睦美, 福場博保: トマトジュースの連続飲用による血清中のカロテノイド濃度の上昇. 日本栄養・食糧学会誌 **47**, 93-99 (1994)
- 16) Nagao A, Doring A, Hoshino C, Terao J, Olson JA: Stoichiometric conversion of all trans- β -carotene to retinal by pig intestinal extract. *Arch Biochem Biophys* **328**, 57-63 (1996)
- 17) Mordt RC, Walton JC, Burton GW, Hughes L, Ingold KU, Lindsay DA, Moffatt DJ: Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* **49**, 911-928 (1993)
- 18) Khachik F, Beecher GR, Smith JC Jr: Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem* **22**, 236-246 (1995)
- 19) Castenmiller JJM, West CE: Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* **18**, 19-38 (1998)
- 20) Goodman DS, Olson JA: The conversion of all-trans β -carotene to retinol. *Methods in Enzymology* **15**, 462-475 (1969)

(しみず ふみこ 食物科学科)
 (おがわ むつみ 生活科学科)
 (ふくば ひろやす 本学名誉教授)